

JP06062866A

MicroPatent Report

## MUTANT ASPARTOKINASE GENE

**[71] Applicant:** AJINOMOTO CO INC**[72] Inventors:** SUGIMOTO MASAKAZU;  
OGAWA YURI;  
SUZUKI TOMOKO;  
TANAKA AKIKO . . .**[21] Application No.:** JP05101450**[No drawing]****[22] Filed:** 19930427**[43] Published:** 19940308**[30] Priority:** JP 04110292 19920428**Go to Fulltext****[57] Abstract:**

**PURPOSE:** To provide a mutant aspartokinase gene originated from microorganism of the genus *Corynebacterium*. **CONSTITUTION:** The present invention relates to an aspartokinase originated from a bacterial strain of the genus *Corynebacterium* to be used in the fermentative production of amino acid, etc., a DNA fragment coding the enzyme, a recombinant DNA containing the DNA fragment and a bacterial strain of the genus *Corynebacterium* containing the recombinant DNA. L-lysine can be produced by culturing the microorganism.

**[51] Int'l Class:** C12N01554 C12N00912 C12P01308 C12N01554  
C12R00113 C12N01554 C12R00115 C12N00912 C12R00115

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-62866

(43)公開日 平成6年(1994)3月8日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/54	ZNA	9359-4B		
9/12				
// C 12 P 13/08	A	8931-4B		
(C 12 N 15/54		8931-4B	C 12 N 15/00	ZNA A
			審査請求 未請求 請求項の数 9(全 28 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-101450  
(22)出願日 平成5年(1993)4月27日  
(31)優先権主張番号 特願平4-110292  
(32)優先日 平4(1992)4月28日  
(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 00000066  
味の素株式会社  
東京都中央区京橋1丁目15番1号  
(72)発明者 杉本 雅一  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社中央研究所内  
(72)発明者 尾川 由理  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社中央研究所内  
(72)発明者 鈴木 智子  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社中央研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 変異型アスパルトキナーゼ遺伝子

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 コリネバクテリウム属由来の新規な変異型アス  
パルトキナーゼ遺伝子を提供する。

【構成】 アミノ酸などの発酵生産に用いられているコリ  
ネバクテリウム属細菌由来の新規なアスパルトキナーゼ  
及び該酵素をコードするDNA断片に關し、また、該D  
NA断片を含有する組み換えDNAに関する。さらに、  
該組み換えDNAを保有するコリネバクテリウム属細菌  
に關し、該微生物を培養することを特徴とするL-リジ  
ンの製造法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表の配列番号 4 記載のアミノ酸配列あるいは配列番号 4 記載アミノ酸配列の 279番目のThr 残基が Ala以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に変化した配列を有する、コリネバクテリウム属細菌由来であり L-リジン及び L-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されるアスパルトキナーゼ  $\alpha$  サブユニット蛋白質をコードするDNA断片。

【請求項 2】 配列表の配列番号 6 記載のアミノ酸配列あるいは配列番号 6 記載アミノ酸配列の 30番目のThr残基が Ala以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に変化した配列を有する、コリネバクテリウム属細菌由来であり L-リジン及び L-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されるアスパルトキナーゼ  $\beta$  サブユニット蛋白質をコードするDNA断片。

【請求項 3】 配列表の配列番号 12 記載の塩基配列を有するものである請求項 1 記載のDNA断片。

【請求項 4】 配列表の配列番号 14 記載の塩基配列を有するものである請求項 2 記載のDNA断片。

【請求項 5】 請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載されたDNA断片を含有し、コリネバクテリウム属の微生物中で複製可能な組み換えDNA。

【請求項 6】 請求項 5 に記載された組み換えDNAが、コリネバクテリウム属の微生物に導入されて得られるアスパルトキナーゼ活性が親株の 2-20 倍に上昇し、かつアスパルトキナーゼ活性の L-リジン及び L-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害あるいは L-リジン単独によるフィードバック阻害が実質的に解除された形質転換体。

【請求項 7】 請求項 6 に記載された形質転換体を好適な培地にて培養し、生じた L-リジンを分離することを特徴とする L-リジンの製造法。

【請求項 8】 配列表の配列番号 4 記載のアミノ酸配列あるいは配列番号 4 記載アミノ酸配列の 279番目のThr 残基が Ala以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に変化した配列を有する、コリネバクテリウム属細菌由来であり L-リジン及び L-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されるアスパルトキナーゼ  $\alpha$  サブユニット蛋白質。

【請求項 9】 配列表の配列番号 6 記載のアミノ酸配列あるいは配列番号 6 記載アミノ酸配列の 30番目のThr残基が Ala以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に変化した配列を有する、コリネバクテリウム属細菌由来であり L-リジン及び L-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されるアスパルトキナーゼ  $\beta$  サブユニット蛋白質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アミノ酸などの発酵生産に用いられているコリネバクテリウム属細菌由来の新

規なアスパルトキナーゼ及び該酵素をコードするDNA断片に関し、また、該DNA断片を含有する組み換えDNAに関する。さらに本発明は、該組み換えDNAを保有するコリネバクテリウム属細菌に関し、該微生物を培養することを特徴とする L-リジンの製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】 飼料添加物として用いられている L-リジンは通常、コリネ型細菌の L-リジン生産変異株を使って発酵法により生産されている。現在知られている種々の L-リジン生産菌はコリネ型細菌の野生株の人工変異により作られている。この様な人工変異株としては次の様なものがある。S- (2-アミノエチル) -システム (以下、AECと略記する) 耐性変異株、その成長に L-ホモセリン等のアミノ酸を必要とする変異株 (特公昭48-28078号、特公昭56-6499号) 、AECに耐性を示し、更に L-ロイシン、L-ホモセリン、L-プロリン、L-セリン、L-アルギニン、L-アラニン、L-バリン等のアミノ酸を要求する変異株 (米国特許第3708395号及び第3825472号) 、DL- $\alpha$ -アミノ- $\epsilon$ -カプロラクタム、 $\alpha$ -アミノ- $\gamma$ アラウリラクタム、アスパラギン酸- $\alpha$ アノログ、スルファ剤、キノイド、N-ラウロイルロイシンに耐性を示す L-リジン生産変異株、オキザロ酢酸脱炭酸酵素 (デカルボキシラーゼ) または呼吸系酵素阻害剤の耐性を示す L-リジン生産変異株 (特開昭50-53588号、特開昭50-31093号、特開昭52-102498号、特開昭53-9394号、特開昭53-86089号、特開昭55-9783号、特開昭55-9759号、特開昭56-32995号、特開昭56-39778号、特公昭53-43591号、特公昭53-1833号) 、イノシトールまたは酢酸を要求する L-リジン生産変異株 (特開昭55-9784号、特開昭56-8692号) 、フルオロビルビン酸または34°C以上の温度に対して感受性を示す L-リジン生産変異株 (特開昭55-9783号、特開昭53-86090号) 、エチレングリコールに耐性を示し、L-リジンを生産するブレビバクテリウム属またはコリネバクテリウム属の生産変異株 (米国特許出願第333455号) 。

【0003】 さらに、先行技術には組み換えベクターを用いて形質転換されたエシェリヒア・コリ株が開示され、この株はアミノ酸の生産を増加する (米国特許第4278765号参照) 。

【0004】 一方、ブレビバクテリウム属及びコリネバクテリウム属においては菌体内で自律増殖可能でかつ、薬剤耐性マーカー遺伝子を有するベクタープラスミド (米国特許願第386980号参照) 、遺伝子の菌体への導入方法 (特開平2-207791号等) が開示されており、これらの技術を用いた L-スレオニンまたは L-イソロイシン生産菌育成の可能性が開示されている (米国特許願376396号、及び第392145号参照) 。また、 L-リジン生産菌育成に関しても、ベクタープラスミドに L-リジン生合成に関与する遺伝子を組み込み、菌体内で増幅させる技術 (特開昭56-160997号などがある) があるが、遺伝子

をアスパルトキナーゼ（以下AKと記す）と特定し、かつ、L-リジンおよびL-スレオニンによるフィードバック阻害が実質的に解除するようなAK遺伝子上の変異点を明示し、かつその変異がL-リジンの生産性と直接に関与することを明示した例はない。また、変異型AK遺伝子の記載がある例でも、変異型AK遺伝子を安定なプラスミドとして保持させることができない（Cremier, J. et al.; Applied and Environmental Microbiology, June 1991, p. 1746-1752参照）。

#### 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、コリネバクテリウム属細菌の微生物中のリジン生合成の重要な酵素であるAKをL-リジン及びL-スレオニンによるフィードバック阻害、さらにリジン単独によるフィードバック阻害を解除した性質のものに改質し、かつその活性を上昇させることにより、L-リジンの生成・分泌速度が高まったものに改良することである。

#### 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは銳意研究の結果、コリネバクテリウム属細菌より変異型AK遺伝子を取得することに成功し、本発明を完成させた。すなわち本発明は、配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列あるいは配列番号4記載アミノ酸配列の279番目のThr残基がAla以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に変化した配列を有する、コリネバクテリウム属細菌由来でありL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されるアスパルトキナーゼ $\alpha$ サブユニット蛋白質及び該蛋白質をコードするDNA断片である。また本発明は、配列表の配列番号6記載のアミノ酸配列あるいは配列番号6記載アミノ酸配列の30番目のThr残基がAla以外かつ酸性アミノ酸以外のアミノ酸残基に変化した配列を有する、コリネバクテリウム属細菌由来でありL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除され

るアスパルトキナーゼ $\beta$ サブユニット蛋白質及び該蛋白質をコードするDNA断片である。さらに本願発明は、上記DNA断片を含有し、コリネバクテリウム属の微生物中で複製可能な組み換えDNA、及び該組み換えDNAが、コリネバクテリウム属の微生物に導入されて得られるアスパルトキナーゼ活性が親株の2-20倍に上昇し、かつアスパルトキナーゼ活性のL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害あるいはL-リジン単独によるフィードバック阻害が実質的に解除された形質転換体である。本願発明は、上記形質転換体を好適な培地にて培養し、生じたL-リジンを分離することを特徴とするL-リジンの製造法である。

【0007】本発明にいうコリネバクテリウム属の微生物とは、バージーズ・マニュアル・オブ・データーミネイティブ・バクテリオロジー（Bergey's Manual of Determinative Bacteriology）第8版599頁（1974）に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、胞子形成能を有しない桿菌である。また本発明にいうコリネバクテリウム属の微生物とは、従来プレビバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合されたプレビバクテリウム属細菌を含み、またコリネバクテリウム属細菌と非常に近縁なプレビバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネバクテリウム属（プレビバクテリウム属）の微生物のうち特に以下に述べるようなコリネバクテリウム属（プレビバクテリウム属）のグルタミン酸生産性細菌が本発明においては、最も好ましいものである。さらに、ミクロバクテリウム属細菌の中にもグルタミン酸を蓄積するものが知られており、これらも本願発明において使用可能である。

【0008】コリネバクテリウム属（プレビバクテリウム属）のグルタミン酸生産性細菌の野性株の例としては次のようなものがあげられる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム	ATCC 13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミクム	ATCC 15806
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC 15991
コリネバクテリウム・グルタミクム	ATCC 13032, 13060
(プレビバクテリウム・ディバリカタム)	ATCC 14020
(プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム)	ATCC 13869
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC 15990
コリネバクテリウム・メラセコーラ	ATCC 17965
プレビバクテリウム・サッカロリティクム	ATCC 14066
プレビバクテリウム・インマリオフィルム	ATCC 14068
プレビバクテリウム・ロゼウム	ATCC 13825
プレビバクテリウム・フラバム	ATCC 13826
プレビバクテリウム・チオゲニタリス	ATCC 19240
ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム	ATCC 15354

【0009】本発明のコリネバクテリウム属（プレビバクテリウム属）のグルタミン酸生産性細菌には上記のよ

うなグルタミン酸生産性を有する野性株のほかにグルタミン酸生産性を有するまたはグルタミン酸生産性を失った変異株も含まれる。

【0010】AK遺伝子を含むDNA断片の供与菌として野生株を用いた場合、野生型のAK遺伝子を含むDNA断片が取得できる。また、L-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されたAK遺伝子を含むDNA断片を取得するには、AK活性に対するL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除された変異株を用いることによって取得することができる。該変異株は、例えば、通常の変異処理法、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) 等の変異剤処理を施した細胞群の中から取得することができる。AK活性の測定は、Miyajima, R *et al.*; *The Journal of Biochemistry* (1968) 63(2), 139-148に記載される方法を用いることができる。

【0011】AK遺伝子を含むDNA断片の供与菌としては、コリネバクテリウム・グルタミカム (プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム) 野生株ATCC13869及びATCC13869株より変異処理により誘導されたL-リジン生産菌AJ3463 (FERMP-1987) が最も好ましい供与菌である。これらの菌の染色体DNAより野生型AK遺伝子、及びL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子 (以下変異型AK遺伝子と記

(1) pAM 330	特開昭58-67699参照
(2) pHM 1519	特開昭58-77895参照
(3) pAJ 655	特開昭58-192900参照
(4) pAJ 611	同 上
(5) pAJ 1844	同 上
(6) pCG 1	特開昭57-134500参照
(7) pCG 2	特開昭58-35197参照
(8) pCG 4	特開昭57-183799参照
(9) pCG 11	同 上

【0015】ベクターの開裂は、当該DNAを一箇所で切断する制限酵素を用いて切断するか、複数部位を切断する制限酵素を用いて部分的に切断することにより行う。

【0016】ベクターは、染色体遺伝子を切断した際に用いられた制限酵素により切断され、または染色体DNA切断フラグメント及び切断されたベクターのそれぞれの両端に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを接続せしめて、ついでベクターと染色体DNAフラグメントとのライゲーション反応に付される。

【0017】このようにして得られた、染色体DNAとベクターとが連結された組み換えDNAをコリネバクテリウム属細菌に属する受容菌へ導入するには、エシェリヒア・コリK-12について報告されている様な (Mandel, M. and Higa, A., *J. Mol. Biol.*, 53, 159 (1970) 受容菌細

す) を分離し、コリネバクテリウム属 (プレビバクテリウム属) 細菌中で自律増殖可能なベクターに連結し、コリネバクテリウム属 (プレビバクテリウム属) 細菌細胞に導入する。

【0012】AK遺伝子を単離する方法は、コリネバクテリウム属細菌のAK遺伝子を有している株より、まず染色体遺伝子を抽出し (例えは H. Saito and K. Miura *Biochem. Biophys. Acta* 72, 619, (1963) の方法が使用できる。) 、これを適当な制限酵素で切断する。ついで、コリネバクテリウム属細菌細胞内で増殖し得るベクターに接続し、得られた組み換えベクターを用いてコリネバクテリウム属の微生物のAK欠損変異株を形質転換せしめ、AK生成活性を保有するにいたった菌株を単離し、これよりAK遺伝子を分離できる。AK欠損変異株の誘導方法は、上記AK活性に対するL-リジン及びL-スレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が実質的に解除された変異株の誘導方法と同様にして行うことができる。

【0013】染色体遺伝子を切断するために、切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、幅広い種類の制限酵素が使用できる。

【0014】本発明にて使用されるベクターは、コリネバクテリウム属細菌細胞内において増殖し得るものであれどどのようなものでも良い。具体的に例示すれば、以下のものがあげられる。

胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法、またはバチルス・ズブチリスについて報告されている様に (Duncan, C. H., Wilson, G. A. and Young, F. E., *Gene*, 1, 153 (1977)) 細胞がDNAを取り込み得る様に増殖段階 (いわゆるコンピテントセル) に導入する方法により可能である。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類および酵母について知られている様に (Chang, S. and Cho, S. N., *Molec. Gen. Genet.*, 168, 111 (1979); Bibb, M. J., Ward, J. M. and Hopwood, O. A., *Nature*, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 1929 (1978)) 、DNA受容菌を、組み換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストにして組み換えDNAをDNA受容菌に導入することも可能である。

【0018】プロトプラスト法では上記のバチルス・ズ

ブチリスにおいて使用されている方法でも充分高い頻度を得ることができるし、特開昭57-183799に記載されたコリネバクテリウム属のプロトプラストにポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールと二価金属イオンとの存在下にDNAをとり込ませる方法も当然利用できる。ポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールの代りに、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、フィコール、ブルロニックF68（セルバ社）などの添加によってDNAのとり込みを促進させる方法でも同等の結果が得られる。

【0019】あるいはAK遺伝子の取得は、上記のようにして取得された染色体DNAよりPCR (polymerase chain reaction; White, T. J. et al; Trends Genet. 5, 185 (1989) 参照) によりAK遺伝子を増幅することによっても行える。増幅に用いるDNAプライマーはAK遺伝子の全領域あるいは一部領域を含有するDNA二重鎖の両3'末端に相補するものを用いる。AK遺伝子の一部領域だけを増幅した場合には、該DNA断片をプライマーとして全領域を含むDNA断片を遺伝子ライブラリーよりスクリーニングする必要がある。全領域を増幅した場合には、該DNA断片をアガロースゲル電気泳動に供した後、目的のバンドを切り出すことによってAK遺伝子を含有するDNA断片を回収できる。

【0020】DNAプライマーとしては、例えば、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) において既知となっている配列 (Molecular Microbiology (1991) 5(5), 1197-1204, Mol. Gen. Genet. (1990) 224, 317-324 参照) を基にして、AK遺伝子をコードする約1643bpの領域を増幅すべく、5'-TCGCGAAGTAGCACCTGTCACCT-3' と 5'-ACGGAATTCAATCTTACGGCC-3' という配列の23mer及び21merの一本鎖DNAが最適である。DNAの合成はApplied Biosystems社製DNA合成機model 380Bを使用し、ホスホアミダイト法を用いて (Tetrahedron Letters (1981), 22, 1859 参照) 常法に従って合成できる。PCR反応は、宝酒造（株）製DNAサーマルサイクラー PJ2000型を用い、TaqDNAポリメラーゼを用い、供給者により指定された方法に従って行うことができる。

【0021】増幅されたAK遺伝子は、上記したようなコリネバクテリウム属細菌細胞内において増殖し得るべきに接続され、上記したような方法でコリネバクテリウム属細菌細胞に導入される。

【0022】リジンを生産するために、取得されたAK遺伝子が導入され増幅される宿主としては、上記したコリネバクテリウム属グルタミン酸生産性細菌の野生株があげられるが、これ以外にも、ここで構築した組み換えDNAの複製起点と変異型AK遺伝子が機能し、組み換えDNAが複製可能かつ変異型AK活性の増強が可能な菌なら、全て宿主として利用できる。最も好ましい宿主は、コリネバクテリウム・グルタミカム（プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム）野生型株であるAJ12

036株 (FERM-P7559) である。

【0023】以上的方法で取得した、L-リジン及びL-アスレオニンによる相乗的なフィードバック阻害が實質的に解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を含有する組み換えDNAを保有する形質転換体を培養し、培養液に目的のL-リジンを生成蓄積せしめ、これを採取した。

【0024】使用するL-リジン生産用の培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じその他の有機成分を含有する通常の培地である。

【0025】炭素源としては、グルコース、ラクトース、ガラクトース、フラクトースやでんぶんの加水分解物などの糖類、グリセロールやソルビトールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。

【0026】窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機アンモニウム塩、大豆加水分解物などの有機窒素、アンモニアガス、アンモニア水等を用いることができる。

【0027】有機微量栄養源としては、ビタミンB1、L-ホモセリンなどの要求物質または酵母エキス等を適量含有させることができ。これらの他に、必要に応じて、リン酸カリウム、硫酸マグネシウム、鉄イオン、マンガンイオン等が少量添加される。

【0028】培養は好気的条件下で16~72時間実施するのがよく、培養温度は30°C~45°Cに、培養中pHは5~7に制御する。尚、pH調整には無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更にアンモニアガス等を使用することができる。発酵液からの芳香族アミノ酸の採取は通常イオン交換樹脂法、沈澱法その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

【0029】

【実施例】以下、実施例に基づき、発明の内容を詳細に説明する。

【0030】（実施例1 野生型及び変異型AK遺伝子の取得とコリネバクテリウム用プラスミドの作製）コリネバクテリウム・グルタミカム（プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム）野生株ATCC13869株、及びそれより変異処理により得られたL-リジン生産性変異株AJ3463 (FERM-P1987) より常法に従い、染色体DNAを調製した。染色体DNAよりPCR (polymerase chain reaction; White, T. J. et al; Trends Genet. 5, 185 (1989) 参照) によりAK遺伝子を増幅した。増幅に用いたDNAプライマーはコリネバクテリウム・グルタミカムにおいて既知となっている配列 (Molecular Microbiology (1991) 5(5), 1197-1204, Mol. Gen. Genet. (1990) 224, 317-324 参照) を基にしてAK遺伝子をコードする約1643bpの領域を増幅すべく、5'-TCGCGAAGTAGCACCTGTCACCT-3' (配列番号15) と 5'-ACGGAATTCAATCTTACGGCC-3' (配列番号16) という配列の23mer及び21merの一本鎖DNAを合

成した。DNAの合成はApplied Biosystems社製DNA合成機 model 380Bを使用し、ホスホアミダイト法を用いて (Tetrahedron Letters (1981), 22, 1859参照) 常法に従って合成した。PCR反応は、宝酒造(株)製DNAサーマルサイクラー PJ2000型を用い、TaqDNAポリメラーゼを用い、供給者により指定された方法に従って遺伝子増幅を行なった。増幅した1643kbの遺伝子断片をアガロースグル電気泳動により確認した後、ゲルより切り出した該断片を常法により精製し、制限酵素NruI (宝酒造(株)製) 及びEcoRI (宝酒造(株)製) にて切断した。遺伝子断片のクローニング用ベクターにはpHSG399 (Takeshita, S *et al*; Gene (1987), 61, 63-74参照) を用いた。pHSG399を制限酵素SmaI (宝酒造(株)製) 及び制限酵素EcoRIにて切断し、増幅したAK遺伝子断片と接続した。DNAの接続はDNAライゲーションキット (宝酒造(株)製) を用い、指定された方法にて行なった。この様にしてpHSG399にプレビバクテリウム染色体より増幅されたAK遺伝子断片の接続されたプラスミドを作製した。野生株であるATCC13869由來のAK遺伝子を有するプラスミドをp399AKY、L-リジン生産菌であるAJ3463由來のAK遺伝子を有するプラスミドをp399AK9と命名した。

【0031】p399AKY、p399AK9に、それぞれコリネバクテリウム属細菌中でプラスミドを自律増殖可能にする能力をもつDNA断片 (以下Coryne.-oriと記す) を導入し、コリネバクテリウム属細菌中で自律複製可能なAK遺伝子を搭載したプラスミドを作製した。Coryne.-oriを取得するために、エシェリヒア・コリと、コリネバクテリウム属細菌の双方の菌体中で自律増殖可能なプラスミドベクターpHK4を作成した。エシェリヒア・コリとコリネバクテリウム属細菌中の双方で自律増殖可能なプラスミドベクターは、いくつか報告がある。ここでは、pAJ1844(特開昭58-216199参照)と、pHSG298(S. Takeshita *et al* : Gene 61, 63-74 (1987) 参照)から、新規のシャトルベクターpHK4を構築した。pAJ1844を制限酵素Sau3AIで部分切断し、制限酵素BamHIで完全切断したpHSG298と連結した。連結後のDNAをコリネバクテリウム・グルタミカム (プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム) AJ12036 (FERM-P7559) に形質転換した。形質転換の方法は、電気パルス法(特開平2-207791参照)を用いた。形質転換体の選択は、カナマイシン25μg/mlを含むM-CM2Gプレート(グルコース5g、ポリペプトン10g、酵母エキス10g、NaCl5g、DL-メチオニン0.2g、寒天15gを純水1lに含む。pH7.2)にて行った。形質転換体からプラスミドを調製し、大きさの最も小さいものを選択し、pHK4と命名した。このプラスミドは、エシェリヒア・コリと、コリネバクテリウム属細菌中で自律増殖でき、宿主にカナマイシン耐性を付与する。

【0032】pHK4を制限酵素KpnI (宝酒造(株)製) にて切断し、切断面を平滑末端化する。平滑末端化はDNA

Blunting kit (宝酒造(株)製) を用い、指定された方法にて行なった。平滑末端化後、リン酸化済みBamHIリンカー (宝酒造(株)製) を接続し、pHK4よりCoryne.-ori部分のDNA断片をBamHIのみによる切断によって切り出される様改変した。このプラスミドをBamHIにより切断し、生じたCoryne.-ori DNA断片と同じくBamHIにて切断したp399AKY、p399AK9に接続し、コリネバクテリウム属細菌中で自律増殖可能かつAK遺伝子を含むプラスミドを作製した。p399AKY由來の野生型AK遺伝子を含むプラスミドをp399AKYBと命名し、p399AK9由來の変異型AK遺伝子を含むプラスミドをp399AK9Bと命名した。p399AK9B、p399AKYB構築の過程を図1に示す。コリネバクテリウム・グルタミカム (プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム) 野生型株であるAJ12036株 (FERM-P7559) に変異型AKプラスミドp399AK9Bを導入した株AJ12691は、受託番号(FERM-P12918)が付与され通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【0033】(実施例2 コリネバクテリウム・グルタミカムの野生型AK及び変異型AK遺伝子の塩基配列の決定) 野生型AK遺伝子を含むプラスミドp399AKY及び変異型AK遺伝子を含むプラスミドp399AK9を調製し、野生型及び変異型AK遺伝子の塩基配列の決定を行なった。塩基配列の決定はサンガーラの方法 (F. Sanger *et al* : Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463 (1977) などがある) によった。p399AKYにコードされている野生型AK遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号1に、p399AK9にコードされている変異型AK遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号2に記す。変異型AK遺伝子は野生型AKと比べ、1051番目のGがAに変化しているという1塩基の変異のみを有する。AK遺伝子は、同一のDNA鎖にα、βの2本のサブユニットが同一のリーディングフレームでコードされていることが知られているが (Kalinowski, J. *et al*; Molecular Microbiology (1991) 5(5), 1197-1204参照)、相同性から判断して本遺伝子も同一のDNA鎖にα、βの2本のサブユニットが同一のリーディングフレームでコードされていると考えられる。

【0034】DNA塩基配列より推定される野生型AK蛋白質のαサブユニットのアミノ酸配列を配列表の配列番号3に、βサブユニットのアミノ酸配列を配列表の配列番号5に示す。DNA配列とアミノ酸配列を同時に示したものは、αサブユニットは配列表の配列番号7に、βサブユニットは配列表の配列番号9に示す。αβ各サブユニットのオープンリーディングフレーム部の塩基配列を配列表の配列番号11、13に示す。

【0035】同様にDNA塩基配列より推定される変異型AK蛋白質のαサブユニットのアミノ酸配列を配列表の配列番号4に、βサブユニットのアミノ酸配列を配列表の配列番号6に示す。DNA配列とアミノ酸配列を同時に示したものは、αサブユニットは配列表の配列番号8に、βサブユニットは配列表の配列番号10に示す。

$\alpha$   $\beta$  各サブユニットのオープンリーディングフレーム部の塩基配列を配列表の配列番号 12, 14 に示す。

【0036】尚、各サブユニットとも、開始コドンに G TG が用いられており、対応するアミノ酸をメチオニンと表記しているが、これは、メチオニン、バリン、またはフォルミルメチオニンを表すものである。変異型 AK 遺伝子の変異点は、変異型 AK 蛋白質がアミノ酸配列において、 $\alpha$  サブユニットにおいて 279 番目のアラニンがスレオニンに、 $\beta$  サブユニットにおいて 30 番目のアラニンがスレオニンにというアミノ酸置換を起こしていることを意味する。

【0037】(実施例 3 コリネバクテリウム・グルタミカム野生株における変異型 AK と野生型 AK プラスミドの導入による L-リジン生産能への効果) コリネバクテリウム・グルタミカム (プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム) 野生型株である AJ12036 株 (FERM-P7559) に野生型 AK プラスミド p399AKYB 及び変異型 AK プラスミド p399AK9B を各々導入した株を作製した。コリネバクテリウムへの遺伝子導入は、電気パルス法によった。宿主のコリネバクテリウム・グルタミカム (プレビ

バクテリウム・ラクトファーメンタム) AJ12036 株、野生型 AK プラスミドを保持する AJ12690 株および、変異型 AK プラスミドを保持する AJ12691 (FERM-P12918) 株のアスパルトキナーゼ活性を測定した。活性測定は、常法に従った (Miyajima, R et al; The Journal of Biochemistry (1968) 63(2), 139-148 参照)。表 1 に示す様に AK プラスミド導入により AK の比活性が約 1.0 ~ 1.5 倍に増大していること、及び変異型 AK プラスミド導入株についてのみ、L-リジン及び L-スレオニンによる相乗阻害が解除していることを確認した。表 1 は、コリネバクテリウム・グルタミカム (プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム) 野生型株 AJ12036 株、及びそれに野生型 AK プラスミドを保持させた AJ12690 株、変異型 AK プラスミドを保持させた AJ12691 株の菌体破碎液のアスパルトキナーゼ比活性、及びその L-リジン及び L-スレオニンによる相乗阻害の程度を表したものである。阻害剤の L-リジン、及び L-スレオニンは各々最終濃度 1 mM となるよう添加した。

【0038】

【表 1】

菌 株	AK 比活性 (mU/mg protein)	
	無 添加	+1 mM L-Lys, +1 mM L-thr
AJ12036	19.0	2.6
AJ12690	235.3	34.5
AJ12691	210.5	145.3

【0039】野生株 AJ12036、野生型 AK プラスミド保持株 AJ12690、変異型 AK プラスミド保持株 AJ12691 (FERM-P12918) のリジン生産能を培養評価した。培養評価はリジン生産培地 (グルコース 100g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  55g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1g, 大豆蛋白酸加水分解物「豆浸」50ml,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  10mg, ニコチン酸アミド 5mg, 及び  $\text{CaCO}_3$  50g を純水 1l に含む。pH 8.0) に植菌し、31.5 °C にて 72 時間往復振とう培養しておこなった。培養後の培養液中のリジン生成量は表 2 に示す通りである。変異型 AK プラスミド導入株により、L-リジン生産能が著しく向上していることがわかる。また、培養終了時のブ

ラスミド保持率をプラスミドの薬剤耐性マーカーであるクロラムフェニコールの耐性を指標にして測定したが、ほぼ 100% と極めて高いプラスミドの安定性を示した (表 2)。表 2 は、コリネバクテリウム・グルタミカム (プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム) 野生型株 AJ12036 株、及びそれに野生型 AK プラスミドを保持させた AJ12690 株、変異型 AK プラスミドを保持させた AJ12691 株の L-リジンの発酵生産能、及び培養終了時のプラスミド保持率を測定した結果である。

【0040】

【表 2】

菌株	Lys蓄積量(g/l)	プラスミド保持率(%)
AJ12036	0	-
AJ12690	2	100
AJ12691	25	98

-はデータ無し

【0041】(実施例4 コリネバクテリウム・グルタミカムの野生型AK及び変異型AKの酵素解析) AKの酵素活性を測定、評価するにあたり、宿主としてエシェリヒア・コリのAK完全欠損株 Gif106M1 を用いた (Boy, E and Patte, J. C., J. Bacteriol. 112, 84-92 (1972), Theze, J. et al., J. Bacteriol. 117, 133-143 (1974))。コリネバクテリウム属細菌にはAK欠損株が無いために、宿主のAKとプラスミド由來のAKが混在してしまい、正確に測定できないと考えられたためである。多くのコリネバクテリウム属細菌の遺伝子はエシェリヒア・コリ中で発現することが知られており、またこのAK遺伝子は pHSG399 上の lac プロモータ一下流に連結されているため、エシェリヒア・コリ中で発現可能であると予想された。

【0042】まず Gif106M1 を実施例1で作製した p399AKY、p399AK9 で形質転換し、以下に示す最少培地 M9 での生育を相補することを確認した。これによりブコリネバクテリウム属細菌のAKがエシェリヒア・コリ菌体中で発現、機能することを確認した。

最少培地 M9

A 20×M9 (g/L)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 303

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 60

NaCl 10

NH<sub>4</sub>Cl 20

B 1M MgSO<sub>4</sub>

C 50% Glucose

D 1g/L Thiamine

別々に滅菌し、A : B : C : D : 水 = 5:0.1:1:0.1:95 の割合で混合する。

【0043】続いてこの菌体より無細胞抽出液を調製

し、AKの酵素活性を測定した。

【0044】AKの酵素活性を測定する際、酵素反応液中に種々の濃度のリジンやスレオニンを加え、阻害の度合を調べた(図2)。その結果、変異型AKは、リジン単独の阻害は野生型に比べほとんど改善がみられないが、スレオニンによる阻害は、100% 解除され、さらに若干活性化すること、このスレオニンによる阻害解除の結果、リジン+スレオニンの協奏阻害が緩和されていることがわかった (Ki値 0.4mM → 5.0mM)。

【0045】(実施例5 コリネバクテリウム・グルタミカムの阻害解除型AK遺伝子の作製) 実施例4より変異型AKはリジンによる単独阻害の解除が不十分であることが判明したため、変異を導入しこの性質の改良を行うことにした。

【0046】阻害解除型AK遺伝子の作製方法としては、部位特異的変異を用い、実施例2で示した変異点(27<sup>9</sup>Ala→Thr)を他のアミノ酸に置換することにした。目的部位に目的の変異を起こす部位特異的変異法としてはPCRを用いる方法(Higuchi, R., 61, in PCR technology (Erlich, H. A. Eds., Stockton press(1989))), ファージを用いる方法(Kramer, W. and Frits, H. J. Meth. in Enzymol., 154, 350(1987); Kunkel, T. A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367(1987))などがある。

【0047】変異によって導入するアミノ酸の種類としては、20種類のアミノ酸を極性や分子構造などの各々の性質により分類し、代表的なもの8種(Arg, Asp, Cys, Phe, Pro, Ser, Tyr, Val)を選んだ。各々の変異点のアミノ酸変異、及び塩基置換を表3に示す。

【0048】

【表3】

特許変異型表

変異名	変異点及びアミノ酸変化				プラスミド名( <sup>Coryne-</sup> <sub>ori</sub> 導入名)
野生型					p399AKY (p399AKYB)
Thr	<sup>279</sup> Ala	GCT	→	Thr A*CT	p399AK9 (p399AK9B)
Arg	<sup>279</sup> Ala	GCT	→	Arg C*G*T	p399AKAR (p399AKARB)
Asp	<sup>279</sup> Ala	GCT	→	Asp GA*T	p399AKAD
Cys	<sup>279</sup> Ala	GCT	→	Cys T*G*T	p399AKAC (p399AKACB)
Phe	<sup>279</sup> Ala	GCT	→	Phe T*T*T	p399AKAF (p399AKAFB)
Pro	<sup>279</sup> Ala	GCT	→	Pro C*CT	p399AKAP (p399AKAPB)
Ser	<sup>279</sup> Ala	GCT	→	Ser T*CT	p399AKAS (p399AKASB)
Tyr	<sup>279</sup> Ala	GCT	→	Tyr T*A*T	p399AKAY (p399AKAYB)
Val	<sup>279</sup> Ala	GCT	→	Val GT*T	p399AKAV (p399AKAVB)

【0049】変異の導入方法としては、変異が導入される279番目のAla残基のコドンを目的のアミノ酸残基のコドンに置換した23merの合成DNA 8種を考案し(Arg 導入用合成DNAは5'-GCCAGGGCAG CGT GCCAAGGTTT-3' :配列番号17, Asp 導入用合成DNAは5'-GCCAGGGCAG GAT GCCAAGGTTT-3' :配列番号18, Cys 導入用合成DNAは5'-GCCAGGGCAG TGT GCCAAGGTTT-3' :配列番号19, Phe 導入用合成DNAは5'-GCCAGGGCAG TTT GCC AAGGTTT-3' :配列番号20, Pro 導入用合成DNAは5'-GCCAGGGCAG CCT GCCAAGGTTT-3' :配列番号21, Ser 導入用合成DNAは5'-GCCAGGGCAG TCT GCCAAGGTTT-3' :配列番号22, Tyr 導入用合成DNAは5'-GCCAGGGCAG CGAG TAT GCCAAGGTTT-3' :配列番号23, Val 導入用合成DNAは5'-GCCAGGGCAG GTT GCCAAGGTTT-3' :配列番号24である)、その相補配列と併せて16種類の23mer一本鎖DNAを合成した。たとえばArg残基を導入する場合、5'-GCCAGGGCAG CGT GCCAAGGTTT-3'なる配列を有する一本鎖DNA、その相補鎖一本鎖DNA、配列

番号15の配列を有する一本鎖DNA、及び配列番号16の配列を有する一本鎖DNAをプライマーとし、p399AKYを録型にしてPCR法を行った。非特異的変異の導入を除くため、作製されたDNAから変異点を含む約280塩基対を制限酵素(NaeI-AvaII)を用いて切り出し、p399AKYの該当部位と置換した。置換した領域については塩基配列の確認を行った。

【0050】(実施例6 変異型AK遺伝子8種の酵素解析)実施例4と同様の方法により、Gif106M1を実施例5で得られた各変異型AK遺伝子を含むプラスミド8種で形質転換し、無細胞抽出液を調製し、酵素解析を行った。表4にリジン5mM、スレオニン5mM、リジン5mM+スレオニン5mM添加時の阻害解除度、比活性を示す。図3、図4、図5にリジン、スレオニン各濃度添加時の阻害解除度をグラフで示す。

【0051】

【表4】

	比活性(mU/mg protein)	5mM Lys(%)	5mM Thr(%)	5mM Lys+Thr(%)
野生型	15.3	42.3	62.3	9.2
Thr	12.9	47.0	103.5	50.4
Pro	2.8	76.9	126.9	103.8
Cys	15.4	56.3	108.1	17.0
Ser	8.2	52.6	131.6	18.4
Val	21.8	51.1	98.3	52.3
Arg	7.6	40.6	107.2	47.8
Tyr	14.4	14.4	103.6	19.4
Phe	18.7	12.1	103.0	18.2
Asp	1.5	—	—	—

【0052】の上うな酵素アミノ酸に並び替わる場合はAKは失活したが、その他のいずれのアミノ酸に変化させた場合もスレオニンによる阻害は解除された。それ以外の性質についてはほぼ4つのグループに分けら

れ。実施例2の変異型(Thr)に類似した変異としてはVal 残基導入変異株、Arg 残基導入変異株がある。Cys 残基導入変異株、Ser 残基導入変異株はリジン単独の阻害は野生型と同等であるが、協奏阻害になると阻害が強

化される結果となった。これはスレオニンに対する挙動が、低濃度では活性化されるが、高濃度になると阻害を受ける山型のグラフとなる特徴的な性質であるために協奏阻害が強化したと考えられる。芳香族アミノ酸である Phe 残基導入変異株、Tyr 残基導入変異株のリジン単独の阻害は野生型よりも強化された。Pro は立体構造に与える影響が大きいためか Pro 残基導入変異株は比活性が低いが（野生型の約 1/5）、リジンの単独阻害は緩和しており、スレオニンによる活性化の度合も大きくなっている（120% 以上）。そのため協奏阻害も解除された。

【0053】変異導入によってできた酵素の構造の安定性の指標として、熱安定性の検討を行なった。処理条件は野生型 AK の活性が約 80% になる 55°C 1.5 時間に設定した。Cys 残基導入変異株、Thr 残基導入変異株、Phe 残基導入変異株、Tyr 残基導入変異株、Val 残基導入変異株は野生型よりも安定性が高く、中でも最も安定

性の高いものは Val 残基導入変異株であった（図 6）。

【0054】（実施例 7 コリネバクテリウム・グルタミカム野生株における変異型 AK 遺伝子 8 種と野生型 AK 遺伝子含有プラスミドの導入による L-リジン生産能への効果）実施例 3 と同様にコリネバクテリウム・グルタミカム（プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム）野生株である AJ12036 株（FERM-P7559）に表 3 に示す 8 種のプラスミドを導入した株を作製し、それぞれの株について AK 活性を測定した。表 5 に示すように比活性は宿主の約 20～80 倍に増大した。リジン、スレオニンによる阻害解除度は実施例 6 と同様であり、もっとも阻害解除度の高いものは Pro であり、リジン単独、スレオニン単独、両方による協奏阻害いずれにおいても Thr の変異型を上回った。

【0055】

【表 5】

#### 特許930210BOAK

	比活性(mU/mg protein)	5mM Lys(%)	5mM Thr(%)	2mM Lys+Thr(%)
AJ12036	5.6	52.0	87.0	7.0
野生型	316.4	52.7	86.8	6.2
Thr	374.4	58.7	109.1	78.3
Arg	197.4	41.4	106.8	58.6
Cys	257.0	66.5	135.7	60.6
Phe	447.7	14.6	105.0	32.4
Pro	125.0	77.5	123.2	85.2
Ser	406.8	55.0	114.4	37.0
Tyr	425.6	16.1	104.8	32.2
Val	448.9	60.5	103.5	75.5

【0056】さらにこれらの 9 種の株について実施例 3 と同様の方法でリジン生産能を培養評価した。培養度の培養液中のリジン生成量は表 6 に示す通りである。変異型 AK プラスミド導入により L-リジン生産能が著しく向上していることがわかる。特に Cys 残基導入変異株、Ser 残基導入変異株以外の変異では約 25g/1 の高い蓄積を示した。また培養終了時のプラスミド保持率もほぼ 100% と高いプラスミドの安定性を示した。

【0057】

【表 6】

#### 特許培養

	Lys-HCl(g/l)	プラスミド保持率(%)
野生型	0.00	100
Thr	24.25	100
Arg	24.56	100
Cys	13.41	100
Phe	25.14	100
Pro	25.11	100
Ser	5.72	100
Tyr	25.12	100
Val	25.02	100

【0058】

【発明の効果】プレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの AK 遺伝子であって、配列番号 3 のアミノ酸番号にして 279 位または配列番号 5 のアミノ酸番号にして 30 位の Ala を酸性アミノ酸以外のアミノ酸に変化さ

せることにより、スレオニンによる阻害が完全に解除し、その結果リジン＋スレオニンによる協奏阻害の解除されたAKを取得した。特にProに変化させることにより、リジンによる単独阻害が部分的に解除したAKを取得した。同部位をVal、Tyr、Pheに変化させることにより、熱安定性が向上したAKを取得した。コリネ型細菌細胞中でこれら変異型AKの活性を増大させることにより、L-リジンの生産性を著しく上昇させることができた。

【0059】

【配列表】

配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTGTCTC AAATATTAAC TCGAATATCA ATATACGGTC	60
TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCCTGT	120
GCAGAAAGAA AACACTCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180
GTAACGTGCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAAGGTGG CCCTGGTCGT ACAGAAATAT	240
GGCGGTTCTC CGCTTGAGAG TCGCGAACCC ATTAGAAACG TCGCTGAACG GATCGTTGCC	300
ACCAAGAAGG CTGAAATGA TGTCTGGTT CTCTCCTCCG CAATGGAGA CACCACCGAT	360
GAACCTCTAG AACCTGCAGC GGCAGTGAAAT CCCGTTCCGC CAGCTCGTGA AATGGATATG	420
CTCCTGACTG CTGGTGAGCG TATTTCTAAC GCTCTCGTGC CCATGGCTAT TGAGTCCCTT	480
GGCGCAGAAG CTCAACTCTT CACTGGCTC CAGGGTGGTG TGCTCACCAC CGAGCCAC	540
GGAAACGCAC GCATTTGGA CGTCACACCG CGTCCTGTGCG TGAAAGCCACT CGATGAGGGC	600
AAGATCTGCA TTGTTGCTGG TTTTCAGGGT CTTAATAAAAG AAACCCCGGA TGTCACCAACG	660
TTGGGTCTGTG GTGGTTCTGA CACCACTGCA GTTGGCTTGG CAGCTGCTTT GAACGCTGAT	720
GTGTGTGAGA TTACTCGGA CGTTGACCGT GTGTATAACCG CTGACCCGGG CATCGTTCCCT	780
AATGCCACAGA AGCTGGAAA GCTCAGCTTC GAAGAAATGC TGGAACCTTG TGCTGTTGGC	840
TCCAAGATTG TGGTCTGCG CAGTGTGAA TACCGCTCGT CATTCAATGT CCCACTTCCG	900
GTACGCTCTT CTTAGTAA TGATCCCCC ACTTTGATTG CCGGCTCTAT GGAGGATATT	960
CCTGTGAGA AAGCAGTCTT TACCGGTGTC GCAACCGACA AGTCCGAAGC CAAAGTAACC	1020
GTTCTGGTA TTTCCGATAA GCCAGGGCAG GCTGCCAAGG TTTTCCGTGC GTTGGCTGAT	1080
GCAGAAATCA ACATTGACAT GGTTCTGCAG AACGCTCTCT CTGTGGAAGA CGGCACCAACC	1140
GACATCACGT TCACCTGCC TCGCGCTGAC GGACGCCGTG CGATGGAGAT CTTGAAGAAG	1200
CTTCAGGTTG AGGGCAACTG GACCAATGTG CTTTACGACG ACCAGGTGG CAAAGCTCTCC	1260
CTCGTGGGTG CTGGCATGAA GTCTCACCCCA CGTGTACCG CAGACTTCAT GGAAGCTCTG	1320
CGCGATGTCA ACGTGAACAT CGAATTGATT TCCACCTCTG AGATCCGCAT TTCCGTGCTG	1380
ATCCGTGAG ATGATCTGGA TGCTGCTGCA CGTGCATTGC ATGAGCAGTT CCAGCTGGGC	1440
GGCGAAGACG AAGCCGCTGT TTATCCAGGC ACCGGACGCT AAAGTTTAA AGGAGTAGTT	1500
TTACAATGAC CACCATCGCA GTTGTGGTG CAACCGGCCA GGTGGCCAG GTTATGCCA	1560
CCCTTTGGA AGAGCGCAAT TTCCGAGTG AACTGTGCG TTTCTTGCT TCCCCCGCGTT	1620
CCGCAGGCCG TAAGATTGAA TTC	1643

配列番号：2

配列の長さ：1643

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列番号：1

配列の長さ：1643

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)

株名：ATCC 13869

配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTGTCTC AAATATTAAC TCGAATATCA ATATACGGTC	60
TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCCTGT	120
GCAGAAAGAA AACACTCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180
GTAACGTGCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAAGGTGG CCCTGGTCGT ACAGAAATAT	240

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)

株名：AJ3463

GGCGGTTCTT	CGCTTGAGAC	TCCGGAAACCC	ATTAGAAAACG	TCCGTGAACG	GATCGTTCCC	300
ACCAAGAAGC	CTGGAAATGA	TGTCGCTGTT	GTCCTGCTCG	CAATGGGAGA	CACCCACGGAT	360
GAACTTCTAG	AACTTGAGC	GGCAGTGAA	CCCCTCCGC	CAGCTCGTA	AATGGATATG	420
CTCCTGACTG	CTGGTGAGCG	TATTCCTAAC	GCTCTCGTCC	CCATGGCTAT	TGAGTCCTT	480
GGCGCAGAAG	CTCAATCTT	CACTGGCTCT	CAGGCTGGTG	TGCTCACAC	CGAGCGCCAC	540
GGAAACCCAC	GCATTGTTGA	CGTCACACCG	GGTCGCTGTC	GTGAAGCACT	CGATGAGGGC	600
AAGATCTGCA	TTGTTGTTGG	TTTCAGGGT	GTTAATAAACG	AAACCCCGA	TGTCACACG	660
TTGGGTCTG	GTGGTTCTGA	CAACACTCA	GTTGCGTTGG	CAGCTGCTT	GAACGCTGAT	720
GTGTGTGAGA	TTTACTCGGA	CGTTGACGGT	GTGTATACCG	CTGACCCCCG	CATCGTTCT	780
AATGCCACAGA	AGCTGGAAA	GCTCAGCTTC	GAAGAAATGC	TGGAACCTGC	TGCTGTTGGC	840
TCCAAGATT	TGGTGCTGCC	CAGTGTGAA	TACGCTCTG	CATTCAATGT	GCCACTTCCG	900
GTACGCTCGT	CTTATAGTAA	TGATCCCCGC	ACTTTGATTG	CCGGCTCTAT	GGAGGATATT	960
CCTGTGGAAG	AACCACTCT	TACCGGTGTC	GCAACCCACA	AGTCGGAAGC	CAAAGTAACC	1020
GTTCTGGGTA	TTTCCGATAA	GCCAGGGAG	ACTGCCAAGG	TTTCCGTC	GTTGGCTGAT	1080
GCAGAAATCA	ACATTGACAT	GGTCTCGAG	AACTCTCTC	CTGTGGAAGA	CGGCACCAAC	1140
GACATCACGT	TCACCTGCC	TCGGCTGAC	GGACGCCGTG	CGATGGAGAT	CTTGAAGAAG	1200
CTTCAGGTT	AGGGCAACTG	GACCAATGTG	CTTACCGAGC	ACCAGGTGG	CAAAGTCTCC	1260
CTCGTGGTG	CTGGCATGAA	GTCTCACCA	GGTGTACCG	CAGAGTTCAT	GGAAGCTCTG	1320
CGCGATGTC	ACGTGAACAT	CGAATTGATT	TCCACCTCTG	AGATCCCCAT	TTCCGTCGCTG	1380
ATCCGATGAA	ATGATCTGGA	TGCTGCTGCA	CGTGCATTC	ATGAGCAGTT	CCAGCTGGC	1440
GGCGAAGACG	AAGCCGTCG	TTATGCGAGC	ACCCGACGCT	AAAGTTTAA	AGGAGTAGTT	1500
TTACAATGAC	CACCATCGCA	GTTGTTGGT	CAACCGGCCA	GGTCGCCCCAG	GTATGCCA	1560
CCCTTTGGA	AGAGCCCAAT	TTCCCACTG	ACACTGTCG	TTTCTTGCT	TCCCCGGCTT	1620
CCGCAGGCG	TAAGATTGAA	TTC				1643

配列番号 : 3

配列の長さ : 421

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

起源

生物名 : コリネバクテリウム・グリタミカム (*Corynebacterium glutamum*)

株名 : ATCC13869

配列

Met	Ala	Leu	Val	Val	Gln	Lys	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Ala	16
Glu	Arg	Ile	Arg	Asn	Val	Ala	Glu	Arg	Ile	Val	Ala	Thr	Lys	Lys	Ala	32
Gly	Asn	Asp	Val	Val	Val	Cys	Ser	Ala	Met	Gly	Asp	Thr	Thr	Asp		48
Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Val	Asn	Pro	Val	Pro	Pro	Ala	Arg	64
Glu	Met	Asp	Met	Leu	Leu	Thr	Ala	Gly	Glu	Arg	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu	80
Val	Ala	Met	Ala	Ile	Glu	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Ala	Gln	Ser	Phe	Thr	96
Gly	Ser	Gln	Ala	Gly	Val	Leu	Thr	Thr	Glu	Arg	His	Gly	Asn	Ala	Arg	112
Ile	Val	Asp	Val	Thr	Pro	Gly	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Leu	Asp	Glu	Gly	128
Lys	Ile	Cys	Ile	Val	Ala	Gly	Phe	Gln	Gly	Val	Asn	Lys	Glu	Thr	Arg	144
Asp	Val	Thr	Thr	Leu	Gly	Arg	Gly	Ser	Asp	Thr	Thr	Ala	Val	Ala		160
Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Asn	Ala	Asp	Val	Cys	Glu	Ile	Tyr	Ser	Asp	Val	176
Asp	Gly	Val	Tyr	Thr	Ala	Asp	Pro	Arg	Ile	Val	Pro	Asn	Ala	Gln	Lys	192
Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Phe	Glu	Met	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Val	Gly		208
Ser	Lys	Ile	Leu	Val	Leu	Arg	Ser	Val	Glu	Tyr	Ala	Arg	Ala	Phe	Asn	224
Val	Pro	Leu	Arg	Val	Arg	Ser	Ser	Tyr	Ser	Asn	Asp	Pro	Gly	Thr	Leu	240
Ile	Ala	Gly	Ser	Met	Glu	Asp	Ile	Pro	Val	Glu	Ala	Val	Leu	Thr		256
Gly	Val	Ala	Thr	Asp	Lys	Ser	Glu	Ala	Lys	Val	Thr	Val	Ile			272
Ser	Asp	Lys	Pro	Gly	Glu	Ala	Ala	Lys	Val	Phe	Arg	Ala	Leu	Asp		288
Ala	Glu	Ile	Asn	Ile	Asp	Met	Val	Leu	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Val	Glu	304
Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Ile	Thr	Phe	Thr	Cys	Pro	Arg	Ala	Asp	Gly	Arg	320

Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr	336
Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala	352
Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu	368
Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg	384
Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala	400
Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr	416
Ala Gly Thr Gly Arg	421

配列番号: 4

配列の長さ: 421

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

起源

生物名: コリネバクテリウム・グリタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)

株名: AJ3463

配列

Met Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala	16
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala	32
Gly Asn Asp Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp	48
Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg	64
Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu	80
Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr	96
Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg	112
Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly	128
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg	144
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala	160
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val	176
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys	192
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly	208
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn	224
Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu	240
Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr	256
Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile	272
Ser Asp Lys Pro Gly Glu Thr Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp	288
Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu	304
Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg	320
Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr	336
Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala	352
Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu	368
Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg	384
Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala	400
Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr	416
Ala Gly Thr Gly Arg	421

配列番号: 5

配列の長さ: 172

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

起源

生物名: コリネバクテリウム・グリタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)

株名: ATCC13869

配列

Met Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Va	
l Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala 16	
Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser As	
p Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys 32	

Val	Phe	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Gl	
u	Ile	Asn	Ile	Asp	Met	Val	Leu		48
Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Val	Glu	Asp	Gl	
y	Thr	Thr	Asp	Ile	Thr	Phe	Thr		64
Cys	Pro	Arg	Ala	Asp	Gly	Arg	Arg	Al	
a	Met	Glu	Ile	Leu	Lys	Lys	Leu		80
Gln	Val	Gln	Gly	Asn	Trp	Thr	Asn	Va	
l	Leu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Val	Gly		96
Lys	Val	Ser	Leu	Val	Gly	Ala	Gly	Me	
t	Lys	Ser	His	Pro	Gly	Val	Thr		112
Ala	Glu	Phe	Met	Glu	Ala	Leu	Arg	As	
p	Val	Asn	Val	Asn	Ile	Glu	Leu		128
Ile	Ser	Thr	Ser	Glu	Ile	Arg	Ile	Se	
r	Val	Leu	Ile	Arg	Glu	Asp	Asp		144
Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	Hi	
s	Glu	Gln	Phe	Gln	Leu	Gly	Gly		160
Glu	Asp	Glu	Ala	Val	Val	Tyr	Ala	Gl	
y	Thr	Gly	Arg						172

配列番号：6

配列の長さ：172

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：コリネバクテリウム・グリタミカム(Corynebacterium glutamicum)

株名：AJ3463

配列

Met	Glu	Glu	Ala	Val	Leu	Thr	Gly	Val	Ala	Thr	Asp	Lys	Ser	Glu	Ala		16	
Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Ile	Ser	Asp	Lys	Pro	Gly	Glu	Thr	Ala	Lys		32	
Val	Phe	Arg	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Glu	Ile	Asn	Ile	Asp	Met	Val	Leu		48	
Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Val	Glu	Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Ile	Thr	Phe	Thr		64	
Cys	Pro	Arg	Ala	Asp	Gly	Arg	Arg	Ala	Met	Glu	Ile	Leu	Lys	Leu			80	
Gln	Val	Gln	Gly	Asn	Trp	Thr	Asn	Val	Leu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Val	Gly		96	
Lys	Val	Ser	Leu	Val	Gly	Ala	Gly	Met	Lys	Ser	His	Pro	Gly	Val	Thr		112	
Ala	Glu	Phe	Met	Glu	Ala	Leu	Arg	Asp	Val	Asn	Val	Asn	Ile	Glu	Leu		128	
Ile	Ser	Thr	Ser	Glu	Ile	Arg	Ile	Ser	Val	Leu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Val	Gly		144
Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	His	Glu	Gln	Leu	Gly	Gly			160	
Glu	Asp	Glu	Ala	Val	Val	Tyr	Ala	Gly	Thr	Gly	Arg						172	

配列番号：7

配列の長さ：1643

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

生物名：コリネバクテリウム・グリタミカム(Corynebacterium glutamicum)

株名：ATCC13869

配列の特徴：mat peptide

存在位置：217..1482

特徴を決定した方法：S

起源

配列

TCGGCAAGTA	GCACCTGTCA	CTTTGTCTC	AAATATTTAA	TCGAATATCA	ATATACGGTC		60										
TGTATTATTG	AACGCATCCC	AGTGGCTGAG	ACGCATCCGC	TAAAGCCCCA	GGAACCCCTGT		120										
GCAGAAAGAA	AACACTCCTC	TGGCTAGGTA	GACACAGTTT	ATAAAAGGTAG	AGTTGAGCCG		180										
GTAACGTCA	GCACGTAGAT	CGAAAGGTGC	ACAAAG	GTG	GCC	CTG	GTC	GTA	CAG		234						
				Met	Ala	Leu	Val	Val	Gln								
				1				5									
AAA	TAT	GGC	GGT	TCC	TCG	CTT	GAG	AGT	GGC	GAA	CGC	ATT	AGA	AAC	GTC		282

Lys	Tyr	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Ala	Glu	Arg	Ile	Arg	Asn	Val		
10															20		
GCT	GAA	CGG	ATC	GTT	GCC	ACC	AAG	AAG	GCT	CGA	AAT	GAT	GTC	GTG	GTT	330	
Ala	Glu	Arg	Ile	Val	Ala	Thr	Lys	Lys	Ala	Gly	Asn	Asp	Val	Val	Val		
25															35		
GTC	TGC	TCC	GCA	ATG	GGA	GAC	ACC	ACG	GAT	GAA	CTT	CTA	GAA	CTT	GCA	378	
Val	Cys	Ser	Ala	Met	Gly	Asp	Thr	Thr	Asp	Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	Ala		
40															40		
GCG	GCA	GTG	AAT	CCC	GTT	CCG	CCA	GCT	CGT	GAA	ATG	GAT	ATG	CTC	CTG	426	
Ala	Ala	Ala	Val	Asn	Pro	Val	Pro	Pro	Ala	Arg	Glu	Met	Asp	Met	Leu	Leu	
55															55		
ACT	GCT	GGT	GAG	CGT	ATT	TCT	AAC	GCT	CTC	GTC	GCC	ATG	GCT	ATT	GAG	474	
Thr	Ala	Gly	Glu	Arg	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu	Val	Ala	Met	Ala	Ile	Glu		
75															75		
TCC	CTT	GGC	GCA	GAA	GCT	CAA	TCT	TTC	ACT	GGC	TCT	CAG	GCT	GGT	GTG	522	
Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Ala	Gln	Ser	Phe	Thr	Gly	Ser	Gln	Ala	Gly	Val		
90															90		
CTC	ACC	ACC	GAG	CGC	CAC	GGA	AAC	GCA	CGC	ATT	GTT	GAC	GTC	ACA	CCC	570	
Leu	Thr	Thr	Glu	Arg	His	Gly	Asn	Ala	Arg	Ile	Val	Asp	Val	Thr	Pro		
105															105		
GGT	CGT	GTG	CGT	GAA	GCA	CTC	GAT	GAG	GGC	AAG	ATC	TGC	ATT	GTT	GCT	618	
Gly	Arg	Val	Arg	Glu	Ala	Leu	Asp	Glu	Gly	Lys	Ile	Cys	Ile	Val	Ala		
120															120		
GGT	TTT	CAG	GGT	GTT	AAT	AAA	GAA	ACC	CGC	GAT	GTC	ACC	ACG	TTG	GGT	666	
Gly	Phe	Gln	Gly	Val	Asn	Lys	Glu	Thr	Arg	Asp	Val	Thr	Thr	Leu	Gly		
135															135		
CGT	GGT	GGT	TCT	GAC	ACC	ACT	GCA	GTT	GGG	TTG	GCA	GCT	GCT	TTG	AAC	714	
Arg	Gly	Gly	Ser	Asp	Thr	Thr	Ala	Val	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Asn			
155															155		
GCT	GAT	GTG	TGT	GAG	ATT	TAC	TCG	GAC	GTT	GAC	GGT	GTG	TAT	ACC	GCT	762	
Ala	Asp	Val	Cys	Glu	Ile	Tyr	Ser	Asp	Val	Asp	Gly	Val	Tyr	Thr	Ala		
170															170		
GAC	CCG	CGC	ATC	GTT	CCT	AAT	GCA	CAG	AAG	CTG	GAA	AAG	CTC	AGC	TTC	810	
Asp	Pro	Arg	Ile	Val	Pro	Asn	Ala	Gln	Lys	Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Phe		
185															185		
GAA	GAA	ATG	CTG	GAA	CTT	GCT	GCT	GTT	GGC	TCC	AAG	ATT	TTG	GTG	CTG	858	
Glu	Glu	Met	Leu	Glu	Leu	Ala	Ala	Val	Gly	Ser	Lys	Ile	Leu	Val	Leu		
200															200		
CGC	AGT	GTT	GAA	TAC	GCT	CGT	GCA	TTC	AAT	GTG	CCA	CTT	CGC	GTA	CGC	906	
Arg	Ser	Val	Glu	Tyr	Ala	Arg	Ala	Phe	Asn	Val	Pro	Leu	Arg	Val	Arg		
215															215		
TCG	TCT	TAT	AGT	AAT	GAT	CCC	GGC	ACT	TTG	ATT	GCC	GGC	TCT	ATG	GAG	954	
Ser	Ser	Tyr	Ser	Asn	Asp	Pro	Gly	Thr	Leu	Ile	Ala	Gly	Ser	Met	Glu		
235															235		
GAT	ATT	CCT	GTG	GAA	GAA	GCA	GTC	CTT	ACC	GGT	GTC	GCA	ACC	GAC	AAG	1002	
Asp	Ile	Pro	Val	Glu	Ala	Val	Leu	Thr	Gly	Val	Ala	Thr	Asp	Lys			
250															250		
TCC	GAA	GCC	AAA	GTA	ACC	GTT	CTG	GGT	ATT	TCC	GAT	AAG	CCA	GGC	GAG	1050	
Ser	Glu	Ala	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Ile	Ser	Asp	Lys	Pro	Gly	Glu		
265															265		
															270		
															275		

配列番号 : 8  
配列の長さ : 1643  
配列の型 : 核酸  
鎖の数 : 二本鎖  
トポロジー : 直鎖状  
配列の種類 : genomic DNA  
起源  
生物名 : コリネバクテリウム・グリタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)  
株名 : AJ3463  
配列の特徴 : mat peptide  
存在位置 : 217..1482  
特徴を決定した方法 : S

TCGGAGTA GCACCTGTC AATATTTAA TCGAATATCA ATATAACGGTC	60
TGTTTATTCG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACCGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCCTGT	120
GCAGAAAGAA AACACTCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180
GTAACTGTC A CAGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAAG GTG GCC CTG GTC GTA CAG	234
Met Ala Leu Val Val Gln	
1 5	
AAA TAT GGC GGT TCC TCG CTT GAG AGT GCG GAA CGC ATT AGA AAC GTC	282
Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala Glu Arg Ile Arg Asn Val	
10 15 20	
GCT GAA CGG ATC GTT GCC ACC AAG AAG GCT GGA AAT GAT GTC GTG GTT	330
Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala Gly Asn Asp Val Val Val	
25 30 35	

GTC TGC TCC GCA ATG GGA GAC ACC ACG GAT GAA CTT CTA GAA CTT GCA	378
Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp Glu Leu Leu Glu Leu Ala	
40 45 50	
GCG GCA GTG AAT CCC GTT CCG CCA GCT CGT GAA ATG GAT ATG CTC CTG	426
Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg Glu Met Asp Met Leu Leu	
55 60 65 70	
ACT GCT GGT GAG CGT ATT TCT AAC GCT CTC GTC GCC ATG GCT ATT GAG	474
Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu Val Ala Met Ala Ile Glu	
75 80 85	
TCC CTT CGC GCA GAA GCT CAA TCT TTC ACT GGC TCT CAG GCT GGT GTG	522
Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr Gly Ser Gln Ala Gly Val	
90 95 100	
CTC ACC ACC GAG CCC CAC GGA AAC GCA CCC ATT GTT GAC GTC ACA CCG	570
Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg Ile Val Asp Val Thr Pro	
105 110 115	
GGT CGT GTG CGT GAA GCA CTC GAT GAG GGC AAG ATC TGC ATT GTT GCT	618
Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly Lys Ile Cys Ile Val Ala	
120 125 130	
GGT TTT CAG GGT GTT AAT AAA GAA ACC CGC GAT GTC ACC ACG TTG GGT	666
Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg Asp Val Thr Thr Leu Gly	
135 140 145 150	
CGT GGT GGT TCT GAC ACC ACT GCA GTT GCG TTG GCA GCT GCT TTG AAC	714
Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala Leu Ala Ala Leu Asn	
155 160 165	
GCT GAT GTG TGT GAG ATT TAC TCG GAC GTT GAC GGT GTG TAT ACC GCT	762
Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val Asp Gly Val Tyr Thr Ala	
170 175 180	
GAC CCG CCC ATC GTT CCT AAT GCA CAG AAG CTG GAA AAG CTC ACC TTC	810
Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys Leu Glu Lys Leu Ser Phe	
185 190 195	
GAA GAA ATG CTG GAA CTT GCT GCT GTT GGC TCC AAG ATT TTG GTG CTG	858
Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly Ser Lys Ile Leu Val Leu	
200 205 210	
CGC AGT GTT GAA TAC GCT CGT GCA TTC AAT GTG CCA CTT CGC GTC CCC	906
Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn Val Pro Leu Arg Val Arg	
215 220 225 230	
TCG TCT TAT AGT AAT GAT CCC GGC ACT TTG ATT GCC GGC TCT ATG GAG	954
Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu Ile Ala Gly Ser Met Glu	
235 240 245	
GAT ATT CCT CTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC GGT GTC GCA ACC GAC AAG	1002
Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys	
250 255 260	
TCC GAA GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT TCC GAT AAG CCA GGC GAG	1050
Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu	
265 270 275	
ACT GCC AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT GCA GAA ATC AAC ATT GAC	1098
Thr Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp	
280 285 290	
ATG GTT CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA GAC GGC ACC ACC GAC ATC	1146
Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile	

295	300	305	310	
ACG TTC ACC TGC CCT CGC GCT GAC GGA CGC CGT GCG ATG GAG ATC TTG				1194
Thr Phe Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu				
315	320	325		
AAG AAG CTT CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC AAT GTG CTT TAC GAC GAC				1242
Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp				
330	335	340		
CAG GTC GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCT GGC ATG AAG TCT CAC CCA				1290
Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro				
345	350	355		
GGT GTT ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC GAT GTC AAC GTG AAC				1338
Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Asn				
360	365	370		
ATC GAA TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT TCC GTG CTG ATC CGT				1386
Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg				
375	380	385	390	
GAA GAT GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG				1434
Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln				
395	400	405		
CTG GGC GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC TAA				1482
Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg				
410	415	420	421	
AGTTTTAAAG GAGTAGTTT ACAATGACCA CCATCGCACT TGTTGGTGCA ACCGGCCAGG				1542
TCGGCCAGGT TATGCCGACC CTTTGAAAG AGCCCAATT CCCAGCTGAC ACTGTTGTT				1602
TCTTGCTTC CCCCGTTCC GCAGGCCGTA AGATTGAATT C				1643

配列番号: 9

配列の長さ: 1643

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源

生物名: コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamum*)

株名: ATCC13869

配列の特徴: mat peptide

存在位置: 964..1482

特徴を決定した方法: S

#### 配列

TCGCGAAGTA GCACCTGTCA CTTTGTCCTC AAA	
TATTAAGA TCGAATATCA ATATAACGGTC	60
TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACG	
CATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCCTGT	120
GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GAC	
ACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180
GTAACTGTCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACA	
AAGGTGG CCCTGGTCGT ACAGAAATAT	240
GGCGGTTCCCT CGCTTGAGAG TGCAGAACGC ATT	
AGAAACG TCGCTGAACG GATCGTTGCC	300
ACCAAGAAGG CTGGAAATGA TGTCGTGGTT GTC	
TGCTCCG CAATGGGAGA CACCACGGAT	360
GAACCTTCTAG AACTTGAGC GGCAGTGAAT CCC	
GTTCCGC CAGCTCGTGA AATGGATATG	420
CTCCTGACTG CTGGTGAGCG TATTCTAAC GCT	
CTCGTCG CCATGGCTAT TGAGTCCCTT	480
GGCGCAGAAG CTCAATCTTT CACTGGCTCT CAG	

GCTGGTC	TGCTCACCA	CGAGCGCCAC	540
GGAAACGCAC	GCATTGTTGA	CGTCACACCG	GGT
CGTGTGC	GTGAAGCACT	CGATGAGGGC	600
AAGATCTGCA	TTGTTGCTGG	TTTCAGGGT	GTT
AATAAAG	AAACCCGCGA	TGTCACCA	660
TTGGGTCGTG	GTGGTTCTGA	CACCACTGCA	GTT
GCCTTGG	CAGCTGCTT	GAACGCTGAT	720
GTGTGTGAGA	TTTACTCGGA	CGTTGACGGT	GTG
TATACCG	CTGACCCGCG	CATCGTTCT	780
AATGCACAGA	AGCTGGAAAA	GCTCAGCTTC	GAA
GAAATGC	TGGAACATTGC	TGCTGTTGGC	840
TCCAAGATT	TGGTGCTGCG	CAGTGTGAA	TAC
GCTCGTG	CATTCAATGT	GCCACTTCGC	900
GTACGCTCGT	CTTATAGTAA	TGATCCCAGGC	ACT
TTGATTG	CCGGCTCTAT	GGAGGATATT	960
CCT	GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC GGT		
GTC	GCA ACC GAC AAG TCC GAA	1008	
Met	Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly		
Val	Ala Thr Asp Lys Ser Glu		
1		5	
10		15	
GCC	AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT TCC		
GAT	AAG CCA GGC GAG GCT GCC	1056	
Ala	Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser		
Asp	Lys Pro Gly Glu Ala Ala		
20			
25		30	
AAG	GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT GCA		
GAA	ATC AAC ATT GAC ATG GTT	1104	
Lys	Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala		
Glu	Ile Asn Ile Asp Met Val		
35		40	
45			
CTG	CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA GAC		
GGC	ACC ACC GAC ATC ACG TTC	1152	
Leu	Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp		
Gly	Thr Thr Asp Ile Thr Phe		
50		55	
60			
ACC	TGC CCT CGC GCT GAC GGA CGC CGT		
GCG	ATG GAG ATC TTG AAG AAG	1200	
Thr	Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg		
Ala	Met Glu Ile Leu Lys Lys		
65		70	
75			
CTT	CAG GTT CAG GGC AAC TGG ACC AAT		
GTG	CTT TAC GAC GAC CAG GTC	1248	
Leu	Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn		
Val	Leu Tyr Asp Asp Gln Val		
80		85	

9 0	9 5
GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCT GGC	
ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT	1 2 9 6
Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly	
Met Lys Ser His Pro Gly Val	
	1 0 0
1 0 5	
ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC	
GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA	1 3 4 4
Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg	
Asp Val Asn Val Asn Ile Glu	
	1 1 5
1 1 0	
TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT	
TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT	1 3 9 2
Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile	
Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp	
	1 2 5
1 3 0	
GAT CTG GAT GCT GCT GCA CGT GCA TTG	
CAT GAG CAG TTC CAG CTG GGC	1 4 4 0
Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu	
His Glu Gln Phe Gln Leu Gly	
	1 4 5
1 3 5	
GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA	
GGC ACC GGA CGC TAAAGTTTAA	1 4 9 0
Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala	
Gly Thr Gly Arg	
	1 5 0
1 4 0	
1 5 5	
AGGAGTAGTT TTACAATGAC CACCATCGCA GTT	
GTTGGTG CAACCGGCCA GGTCGGCCAG	1 5 5 0
GTTATGCGCA CCCTTTGGA AGAGCGCAAT TTC	
CCAGCTG ACACTGTTG TTTCTTGCT	1 6 1 0
TCCCCCGCTT CCGCAGGCCG TAAGATTGAA TTC	
	1 6 0
1 6 5	
1 7 0	1 7 2
GGAGTAGTT TTACAATGAC CACCATCGCA GTT	
GTTGGTG CAACCGGCCA GGTCGGCCAG	1 5 5 0
GTTATGCGCA CCCTTTGGA AGAGCGCAAT TTC	
CCAGCTG ACACTGTTG TTTCTTGCT	1 6 1 0
TCCCCCGCTT CCGCAGGCCG TAAGATTGAA TTC	
	1 6 4 3

配列番号 : 10

配列の長さ : 1643

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

起源

生物名 : コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamum*)

株名 : AJ3463

配列の特徴 : mat peptide

存在位置 : 964..1482

特徴を決定した方法 : S

#### 配列

TCGCGAACTA GCACCTGTCA CTTTGTCTC AAATATTAAA TCGAATATCA ATATACGGTC	60
TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCGC TAAAGCCCCA GGAACCCCTGT	120
GCAGAAAGAA AACACTCCTC TGGCTAGGTA GACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180
GTAACTGTCA GCACGTAGAT CGAAAGGTGC ACAAAAGGTGG CCCTGGTCGT ACAGAAATAT	240
GGCGGTTCCCT CGCTTGAGAG TCGCGAACCG ATTACAAACG TCGCTGAACG GATCGTTGCC	300

ACCAACAAGG CTGAAATGA TGTCTGTT GTCTGCTCCG CAATGGAGA CACCACGGAT	360		
GAACCTCTAG AACTTGCAGC GGCAGTGAAT CCCGTTCCGC CAGCTCGTA AATGGATATG	420		
CTCCTGACTG CTGGTGGCC TATTCTAAC GCTCTCGTCCG CCATGGCTAT TGACTCCCTT	480		
GGCGCAGAAG CTCATCTT CACTGGCTCT CAGGCTGGTG TGCTCACCAC CGAGCCGCAC	540		
GGAAACCCAC GCATTGTTGA CGTCACACCC GGTGCTGTC GTGAAGCACT CGATGAGGGC	600		
AAGATCTGCA TTGTTGCTGG TTTTCAGGGT GTTAATAAAG AAACCCCGA TGTCACCACG	660		
TTGGGTCGTG GTGGTCTGA CACCACGCA GTTGGCTGG CAGCTGCTT GAACGCTGAT	720		
GTGTGTGAGA TTTACTCGGA CGTTGACGGT GTGTATACCG CTGACCCCGC CATCGTTCT	780		
AATGCACAGA AGCTGGAAA GCTCAGCTTC GAAGAAATGC TGGAACTTGC TGCTGTTGGC	840		
TCCAAGATT TGGTGTGCG CAGTGTGAA TACGCTCGTGT CATTCAATGT GCCACTTCGC	900		
GTACGCTCGT CTTATAGTAA TGATCCCGGC ACTTTGATTG CCGGCTCTAT GGAGGATATT	960		
CCT GTG GAA GAA GCA GTC CTT ACC GGT GTC GCA ACC GAC AAG TCC GAA	1008		
Val Glu Glu Ala Val Leu Thr Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu			
1 5 10 15			
GCC AAA GTA ACC GTT CTG GGT ATT TCC GAT AAG CCA GGC GAG ACT GCC	1056		
Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile Ser Asp Lys Pro Gly Glu Thr Ala			
20 25 30			
AAG GTT TTC CGT GCG TTG GCT GAT GCA GAA ATC AAC ATT GAC ATG GTT	1104		
Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val			
35 40 45			
CTG CAG AAC GTC TCC TCT GTG GAA GAC GGC ACC ACC GAC ATC ACG TTC	1152		
Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu Asp Gly Thr Thr Asp Ile Thr Phe			
50 55 60			
ACC TGC CCT CGC GCT GAC GGA CGC CGT GCG ATG GAG ATC TTG AAG AAG	1200		
Thr Cys Pro Arg Ala Asp Gly Arg Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys			
65 70 75			
CTT CAG GTT CAG GCC AAC TGG ACC AAT GTG CTT TAC GAC GAC CAG GTC	1248		
Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val			
80 85 90 95			
GGC AAA GTC TCC CTC GTG GGT GCT GGC ATG AAG TCT CAC CCA GGT GTT	1296		
Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val			
100 105 110			
ACC GCA GAG TTC ATG GAA GCT CTG CGC GAT GTC AAC GTG AAC ATC GAA	1344		
Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu Arg Asp Val Asn Val Ile Glu			
115 120 125			
TTG ATT TCC ACC TCT GAG ATC CGC ATT TCC GTG CTG ATC CGT GAA GAT	1392		
Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp			
130 135 140			
GAT CTG GAT GCT GCA CGT GCA TTG CAT GAG CAG TTC CAG CTG GCC	1440		
Asp Leu Asp Ala Ala Arg Ala Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly			
145 150 155			
GGC GAA GAC GAA GCC GTC GTT TAT GCA GGC ACC GGA CGC TAAAGTTTAA	1490		
Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr Ala Gly Thr Gly Arg			
160 165 170 172			
AGGAGTAGTT TTACAATGAC CACCATCGCA GTTGTGGTG CAACCGGCCA GGTGGCCAG	1550		
GTTATGCCCA CCCTTTGGAA AGAGCGCAAT TTCCCAGCTG ACACTGTTCG TTTCTTGCT	1610		
TCCCCGGT CGCGAGGCCG TAAGATTGAA TTC	1643		

配列番号 : 11

配列の長さ : 1263

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

起源

生物名：コリネバクテリウム グルタミカム(*Corynebacterium glutami*

cum)

株名：ATCC 13869

配列

TCGGGAAGTA GCACCTGTCA CTTTGTCTC AAATATTAAGA TCGAATATCA ATATAACGGTC	60
TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCG TAAAGCCCCA GGAACCCCTGT	120
GCAGAAAGAA AACACTCTC TGGCTAGGT ACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180
GTGGCCCTGG TCGTACAGAA ATATGGCGGT TCCCTCGCTT AGAGTGGCGA ACGCATTAGA	60
AACGTCGCTG AACGGATCGT TGCCACCAAG AAGGCTGGAA ATGATGTGCT GTTGTCTGC	120
TCCGCAATGG GAGACACCAAC GGATGAACCT CTAGAACCTTG CAGCGGAGT GAATCCCGTT	180
CCGCCAGCTC GTGAAATGGG TATGCTCTG ACTGCTGGT AGCGTATTTTC TAACGCTCTC	240
GTCGCCATTGG CTATTGAGTC CCTTGGCGCA GAAGCTCAAT CTTTCACTGG CTCTCAGGCT	300
GGTGTGCTCA CCACCGAGCG CCACGGAAAC GCACGGCATG TTGACGTCAC ACCGGGTCGT	360
GTGCGTGAAG CACTCGATGA GGGCAAGATC TGCAATTGTTG CTGGTTTCA GGGTGTAAAT	420
AAAGAAACCC GCGATGTCA CACGGTGGT CGTGGTGGT CTGACACCAAC TGCAGTTGCG	480
TTGGCAGCTG CTTGAACGC TGATGTGCT GAGATTACT CGGACGTTGA CGGTGTGAT	540
ACCGCTGACC CGCGCATCGT TCCCTAATGCA CAGAACGCTGG AAAAGCTCGA CTTCGAAGAA	600
ATGCTGAAAC TTGCTGCTGT TGGCTCCAG ATTTTGGTGC TGGCAGCTGT TGAATACGCT	660
CGTGCAATTCA ATGTGCCACT TCGCTGACCG TCGTCTTATA GAAATGATCC CGGCACCTTG	720
ATTGCGGCTT CTATGGAGGA TATTCTGTG GAAGAACGAG TCCCTACCGG TGTCCCAACC	780
GACAAGTCCG AAGCCAAGT AACCGTTCTG GGTATTTCGG ATAAGCCAGG CGAGGCTGCC	840
AAGGTTTCC GTGCGTGGC TGATGCCAGAA ATCAACATTG ACATGGTCT CGAGAACGTC	900
TCCCTCTGG AAGACGGCAC CACCGACATC ACCTTCACCT GCCCTCGCGC TGACGGACGC	960
CGTGCCTGG AGATCTTGA GAAGCTTCAG GTTCAGGGCA ACTGGACCAA TGTGCTTAC	1020
GACGACCAAGG TCGGCAAAGT CTCCCTGTG GGTGCTGGCA TGAAGTCTCA CCCAGGTGTT	1080
ACCGCAGAGT TCATGGAAAGC TCTGCGGAT GTCAACCTGA ACATCGAATT GATTCACCC	1140
TCTGAGATCC GCATTTCCGT GCTGATCCGT GAAGATGATC TGGATGCTGC TGCACGTGCA	1200
TTGCATGAGC AGTTCCAGCT GGGCGGCCAA GACGAACCGG TCGTTTATGC AGGCACCGGA	1260
CGC	1263

配列番号：12

配列の長さ：1263

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

起源

生物名：コリネバクテリウム グルタミカム(*Corynebacterium glutami*  
cum)

株名：AJ3463

配列

TCGGGAAGTA GCACCTGTCA CTTTGTCTC AAATATTAAGA TCGAATATCA ATATAACGGTC	60
TGTTTATTGG AACGCATCCC AGTGGCTGAG ACGCATCCG TAAAGCCCCA GGAACCCCTGT	120
GCAGAAAGAA AACACTCTC TGGCTAGGT ACACAGTTT ATAAAGGTAG AGTTGAGCGG	180
GTGGCCCTGG TCGTACAGAA ATATGGCGGT TCCCTCGCTT AGAGTGGCGA ACGCATTAGA	60
AACGTCGCTG AACGGATCGT TGCCACCAAG AAGGCTGGAA ATGATGTGCT GTTGTCTGC	120
TCCGCAATGG GAGACACCAAC GGATGAACCT CTAGAACCTTG CAGCGGAGT GAATCCCGTT	180
CCGCCAGCTC GTGAAATGGG TATGCTCTG ACTGCTGGT AGCGTATTTTC TAACGCTCTC	240
GTCGCCATTGG CTATTGAGTC CCTTGGCGCA GAAGCTCAAT CTTTCACTGG CTCTCAGGCT	300
GGTGTGCTCA CCACCGAGCG CCACGGAAAC GCACGGCATG TTGACGTCAC ACCGGGTCGT	360
GTGCGTGAAG CACTCGATGA GGGCAAGATC TGCAATTGTTG CTGGTTTCA GGGTGTAAAT	420
AAAGAAACCC GCGATGTCA CACGGTGGT CGTGGTGGT CTGACACCAAC TGCAGTTGCG	480
TTGGCAGCTG CTTGAACGC TGATGTGCT GAGATTACT CGGACGTTGA CGGTGTGAT	540
ACCGCTGACC CGCGCATCGT TCCCTAATGCA CAGAACCTGG AAAAGCTCGA CTTCGAAGAA	600
ATGCTGAAAC TTGCTGCTGT TGGCTCCAG ATTTTGGTGC TGGCAGCTGT TGAATACGCT	660
CGTGCAATTCA ATGTGCCACT TCGCTGACCG TCGTCTTATA GAAATGATCC CGGCACCTTG	720
ATTGCGGCTT CTATGGAGGA TATTCTGTG GAAGAACGAG TCCCTACCGG TGTGCGAACCC	780

GACAAGTCGG AAGCCAAACT AACCGTTCTG GGTATTTCGG ATAAGCCAGG CGAGACTGCC 840  
 AAGGTTTCCC GTGCGTTGGC TGATGCCAGAA ATCAACATTG ACATGGTTCT GCAGAACGTC 900  
 TCCCTCTGGG AAGACGGCAC CACCGACATC ACGGTCACCT GCCCCTCGGC TGACGGACCC 960  
 CGTGGGATGG AGATCTTGAAGAAGCTTCAG GTTCAGGGCA ACTGGACCAA TGTGCTTAC 1020  
 GACGACCAAGG TCGGCAAAGT CTCCCTCGTG GGTGCTGGCA TGAAGTCTCA CCCAGGTGTT 1080  
 ACCGACAGT TCATGGAAGC TCTGCGGAT GTCAACGTGA ACATCGAATT GATTTCACC 1140  
 TCTGAGATCC GCATTTCCGT GCTGATCCGT GAAGATGATC TGGATCCCTGC TGCAACGTGCA 1200  
 TTGCAATGAGC AGTTCCAGCT GGGCGGGCAA GACGAAGCCG TCGTTATGCC AGGCACCGGA 1260  
 CGC 1263

配列番号 : 13

配列の長さ : 516

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

起源

生物名 : コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)

株名 : ATCC 13869

配列

GTGGAAGAAG CAGTCCTTAC CGGTGTCGCA ACCGACAAGT CGGAAGCCAA AGTAACCGTT 60  
 CTGGGTATT CCGATAAGCC AGGGAGGCT GCCAAGGTT TCCGTGCGTT GGCTGATGCA 120  
 GAAATCAACA TTGACATGGT TCTGCAGAAC GTCTCCTCTG TGGAAAGACGG CACCACCGAC 180  
 ATCACGTTCA CCTGCCCCCG CGCTGACCGA CGCCGTGCGA TGGAGATCTT GAAGAAGCTT 240  
 CAGGTTCAAG GCAACTGGAC CAATGTGCTT TACGACGACC AGGTGGCAA AGTCTCCCTC 300

GTGGGTGCTG GCATGAAAGTC TCACCCAGGT GTTACCCAGG AGTTCATGGA AGCTCTGCC 360  
 GATGTCAACG TGAACATCGA ATTGATTTC ACCTCTGAGA TCCGCATTTC CGTGCTGATC 420  
 CCTGAAAGATG ATCTGGATGC TGCTGCAAGT GCATTGATG AGCAGTTCCA GCTGGGGCGC 480  
 GAAGACCAAG CGTGTGTTA TGCAAGGACCG GGACCC 516

配列番号 : 14

配列の長さ : 516

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA

起源

生物名 : コリネバクテリウム グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*)

株名 : AJ3463

配列

GTGGAAGAAG CAGTCCTTAC CGGTGTCGCA ACCGACAAGT CGGAAGCCAA AGTAACCGTT 60  
 CTGGGTATT CCGATAAGCC AGGGAGGCT GCCAAGGTT TCCGTGCGTT GGCTGATGCA 120  
 GAAATCAACA TTGACATGGT TCTGCAGAAC GTCTCCTCTG TGGAAAGACGG CACCACCGAC 180  
 ATCACGTTCA CCTGCCCCCG CGCTGACCGA CGCCGTGCGA TGGAGATCTT GAAGAAGCTT 240  
 CAGGTTCAAG GCAACTGGAC CAATGTGCTT TACGACGACC AGGTGGCAA AGTCTCCCTC 300  
 GTGGGTGCTG GCATGAAAGTC TCACCCAGGT GTTACCCAGG AGTTCATGGA AGCTCTGCC 360  
 GATGTCAACG TGAACATCGA ATTGATTTC ACCTCTGAGA TCCGCATTTC CGTGCTGATC 420  
 CCTGAAAGATG ATCTGGATGC TGCTGCAAGT GCATTGATG AGCAGTTCCA GCTGGGGCGC 480  
 GAAGACCAAG CGTGTGTTA TGCAAGGACCG GGACCC 516

配列番号 : 15

配列の長さ : 23

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成 DNA

配列

TCGGGAAGTA GCACCTGTCA CTT

23

配列番号 : 16

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成 DNA

配列番号 : 17	配列	ACCGAATTCA ATCTTACGGC C	21
配列の長さ : 23			
配列の型 : 核酸			
配列番号 : 18	配列	GCCAGGGCAG CGTGCCAAGG TTT	23
配列の長さ : 23			
配列の型 : 核酸			
配列番号 : 19	配列	GCCAGGGCAG GATGCCAAGG TTT	23
配列の長さ : 23			
配列の型 : 核酸			
配列番号 : 20	配列	GCCAGGGCAG TGTGCCAAGG TTT	23
配列の長さ : 23			
配列の型 : 核酸			
配列番号 : 21	配列	GCCAGGGCAG TTTGCCAAGG TTT	23
配列の長さ : 23			
配列の型 : 核酸			
配列番号 : 22	配列	GCCAGGGCAG CCTGCCAAGG TTT	23
配列の長さ : 23			
配列の型 : 核酸			
配列番号 : 23	配列	GCCAGGGCAG TCTGCCAAGG TTT	23
配列の長さ : 23			
配列の型 : 核酸			
配列番号 : 24	配列	GCCAGGGCAG TATGCCAAGG TTT	23
配列の長さ : 23			
配列の型 : 核酸			
配列番号 : 25	配列	GCCAGGGCAG GTTGCCAAGG TTT	23
配列の長さ : 23			
配列の型 : 核酸			

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、染色体よりPCRにて増幅されたAK遺伝子断片よりp399AKY、p399AKY、更にBrevi.-oriを導入してp399AKYB、p399AK9Bを構築する過程を示したものである。p399AK9Bはp399AKYBと一塩基の違いがある他は全く同様な過程を経て構築されているので、一緒に()付きで示した。

【図2】図2は野生型と変異型(Thr)AKのリジン、スレオニン、リジン+スレオニンによる阻害について調べたものである。リジン、スレオニン無添加時の活性を100%とし、添加時の活性を活性保持率(阻害解除度)として表わした。

【図3】図3は野生型および変異型8種のAKのリジンによる阻害の解除度について調べたものである。

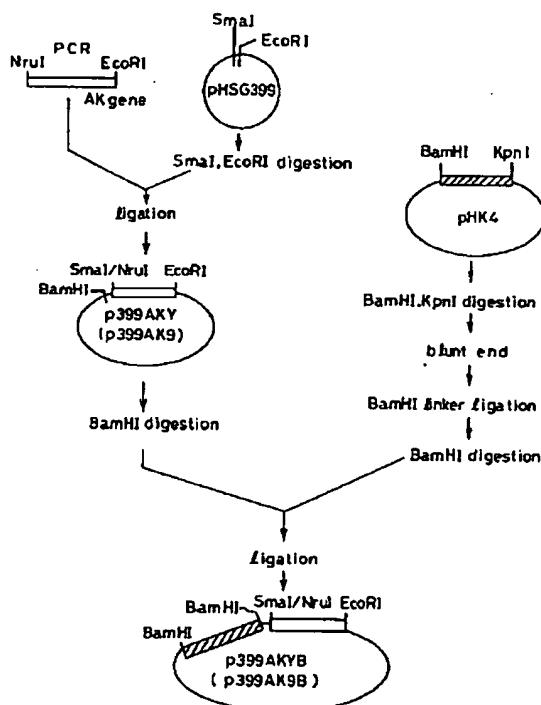
【図4】図4は野生型および変異型8種のAKのスレオニンによる阻害の解除度について調べたものである。

【図5】図5は野生型および変異型8種のAKのリジン+スレオニンによる協奏阻害の解除度について調べたも

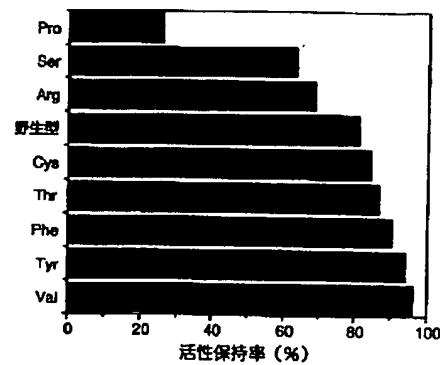
のである。

【図6】図6は野生型および変異型8種のAKの熱安定性について調べたものである。55°C、90分処理後の活性保持率を%で表わした。

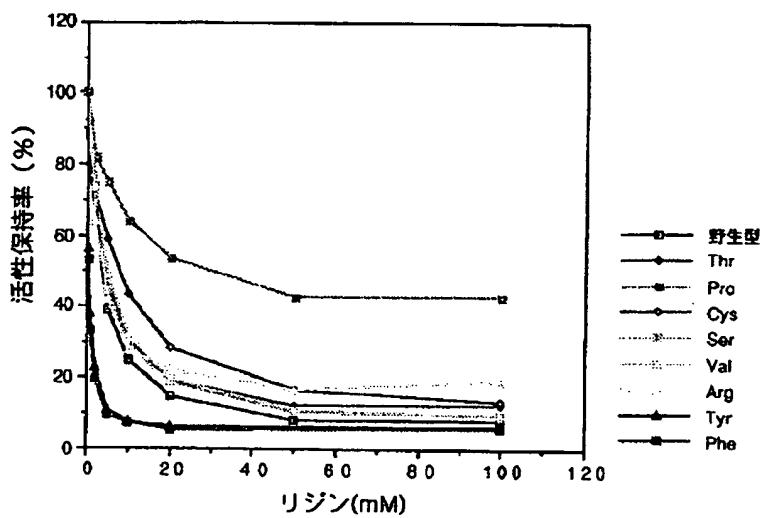
【図1】



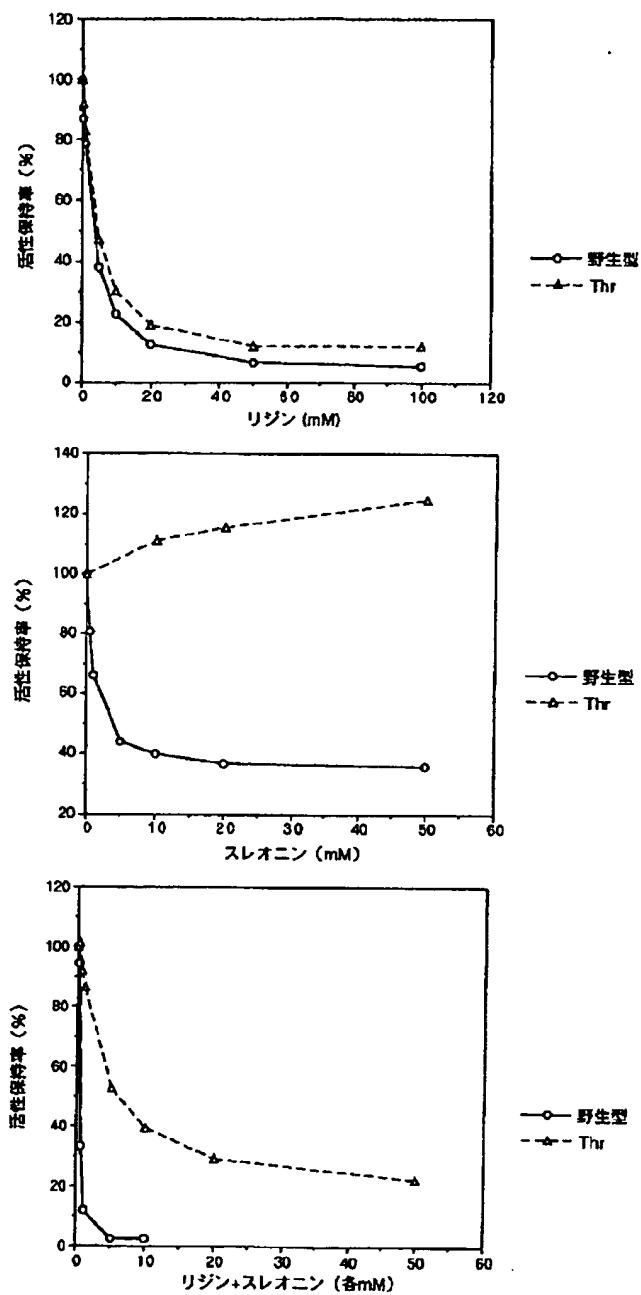
【図6】



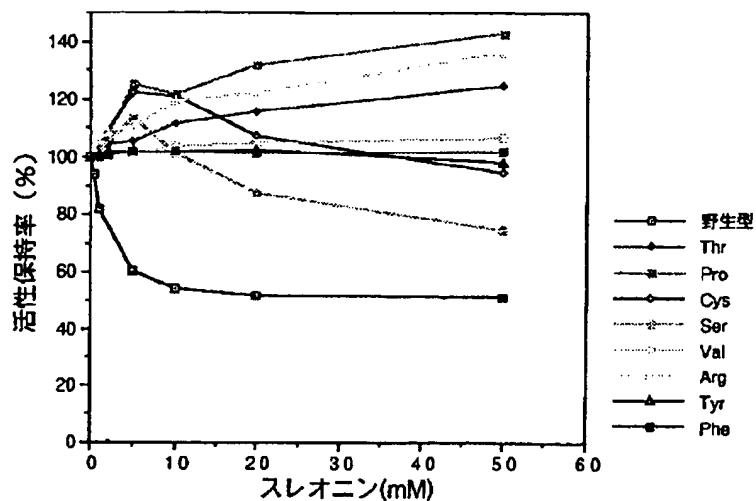
【図3】



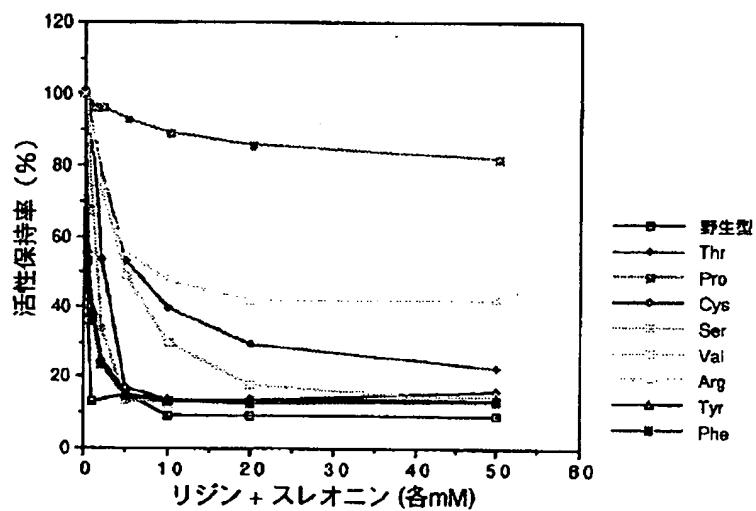
【図2】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 15/54

C 1 2 R 1:15)

(C 1 2 N 9/12

C 1 2 R 1:15)

(72)発明者 田中 朗子  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社中央研究所内

(72)発明者 松井 裕  
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社中央研究所内